

ÇOCUKLUK ÇAĞI EPİLEPSİ OLGULARINDA KARBAMAZEPİNİN NATURAL KILLER (NK) HÜCRELERE ETKİSİ

Özden ANAL*, Güven PAŞAOĞLU*, Eray DİRİK**, Halil ATEŞ***

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı*
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nörolojisi
Bilim Dalı**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Onkoloji Araştırma Laboratuvarı***

ÖZET

Çocukluk çağı epilepsilerinde sık kullanılan karbamazepinin immün sistem hücreleri üzerindeki etkileri konusunda henüz yeterli veri elde edilememiştir. Bu çalışmada, en az altı aydan uzun süredir karbamazepin tedavisi alan epilepsili 18 çocukta (ortalama yaş: 12 yıl) ilacın periferik kan lenfositlerinin T ve NK hücre yüzdeleri ile bu hücrelerin spesifik antijen ekspresyonlarına etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar aynı yaş grubunda ilacı kesilmiş olarak izlenen epilepsili 16 çocuk ve sağlıklı 18 çocuk ile karşılaştırılmıştır.

Karbamazepinin periferik kan lökosit, lenfosit sayıları, T hücre ve NK hücre yüzdeleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. NK hücre yüzeyi CD16/56 ekspresyonu her iki epilepsili hasta grubunda anlamlı olarak ($p < 0.0000$) düşük bulunmuştur.

Sonuçlar karbamazepinin T lenfosit ve NK hücre sayıları üzerinde baskılayıcı bir etki göstermediği; NK hücre yüzey antijenlerinde ise epilepsi zemininde intrinsek bir defekt olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Çocukluk çağı epilepsisi, karbamazepin, natural killer (NK) hücre.

SUMMARY

There is still insufficient data on the effects of widely used anticonvulsant drugs such as carbamazepine on cellular immunity in children. Therefore, this study was planned to assess the quantitative changes in the peripheral blood T and NK cells, and their specific antigen expression in 18 epileptic children (mean age: 12 years) under treatment with carbamazepine for at least six months, in comparison with age-matched 16 epileptic children who have stopped receiving antiepileptics and 18 healthy controls.

The results showed that carbamazepine did not cause a significant decrease in peripheral blood leukocytes, lymphocytes, T or NK cells; while NK cell CD16/56 expression was significantly ($p < 0.0000$) low in the two groups of epileptic children vs healthy controls.

In conclusion, carbamazepine did not have a suppressive effect on T and NK cell counts while NK cells appeared to harbour an intrinsic defect of surface antigen expression related to epilepsy itself.

Key words: Childhood epilepsy, carbamazepine, natural killer (NK) cell.

Çocukluk çağı epilepsilerinde başlıca antikonvülzan ilaçlardan karbamazepinin (CBZ) immün fonksiyonları çeşitli düzeylerde etkileyebileceği düşünülmüştür (1,2). CBZ'in lenfoid dokular ve immün sistem hücrelerindeki periferik benzodiazepin reseptörleri ile etkileşerek nötrofil fonksiyonlarından özellikle kemotaksisi bozduğu, lenfositler üzerinde de immünomodülatör gibi rol oynadığı ileri sürülmüştür (3-5). Periferik kan lenfositlerinin yaklaşık %10'unu antiviral ve

antitümör aktiviteleri ön planda olan natural killer (NK) hücreler oluşturur. Büyük çoğunluğu periferik kan ve dalakta yer alan NK'ların adaptif immün sistemin hem hücresel, hem de humoral bağışıklık işlevlerinde önemli rolleri vardır (6).

Erişkin epilepsi hastaları ve deneysel modellerde CBZ ve metabolitlerinin NK hücrelere etkileri konusunda son 15 yıldır yapılan çalışmalarda elde edilen veriler çelişkili bulunmuştur (7-9). Çocukluk çağı epilepsilerinde CBZ kullanımının

immüniteyi ne yönde etkilediği konusundaki bilgiler henüz az sayıdaki araştırmalara dayanmaktadır (10,11). Bu çalışmalarda epileptik hastalarda gözlenen CD8 T lenfositlerde artışın ve CD4/CD8 oranlarındaki azalmanın nedeninin epilepsi kliniği ya da anti-epileptik ilaçlara bağlı olduğu halen tartışmalıdır.

Bu çalışmada CBZ tedavisi almakta olan epilepsili çocuklar, anti-epileptik tedavisi sonuçlandırılarak ilacı kesilmiş hastalar ve sağlıklı çocuklarda periferik kan NK hücreler ile T lenfosit CD3 ve NK hücre CD16/56 molekül ekspresyonlarının kantitatif değerleri karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar

Primer idiyopatik epilepsi tanısı ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Çocuk Nörolojisi polikliniğinde en az altı ay öncesinden CBZ tedavisi başlanarak izlenmekte olan 18 (9 kız, 9 erkek) hasta (ortalama yaş: 12 ± 3 yıl) ve en az bir yıl önce antikonvülzan tedavisi kesilmiş olarak izlenen 16 (8 kız, 8 erkek) hasta (ortalama yaş: 11 ± 3 yıl) çalışmaya alındı. Epilepsi tanısı tipik konvülsif nöbetlerin varlığı ve EEG ile konuldu. Hastaların hiç birinde yakında infeksiyon geçirme ya da immün yetersizlik bulgusu mevcut değildi.

Aynı yaş grubunda sağlıklı 18 (10 kız, 8 erkek) çocuk (ortalama yaş: 12 ± 3) kontrol grubunu oluşturdu. Kontrol grubundaki çocuklarda ilaç alımı, yakında geçirilmiş infeksiyon, allerji, inflamatuvar hastalık ya da malignansi öyküsü yoktu.

Kontrol grubu okulda genel sağlık taraması sırasında sağlıklı okul çocuklarından oluşturuldu. Epilepsi hastaları pediatrik nöroloji polikliniğine rutin kontrolleri dahilinde çağırılarak çalışmaya

alındı. Tüm çocuklar ve aileleri çalışmanın amacı ve uygulanacak işlemler konusunda bilgilendirilerek izinleri alındı.

Kan örneklerinin alınması ve analizi

Venöz kan örnekleri sabah saat 9:00-10:00 arasında, CBZ alan çocuklar sabah ilaç dozunu almadan toplandı. Her çocuktan EDTA'lı 5 ml kan örneği hemogram ve flow sitometrik analiz için; CBZ alan çocuklardan ayrıca 3'er ml düz kan örneği kan CBZ düzeyi ölçümü için alındı.

Periferik kan T hücre ve NK hücre immünfenotiplendirmeleri floresan işaretli LeucoGATE (CD45/CD14), kontrol ($\gamma 1/ \gamma 2a$), CD3/CD16+CD56 monoklonal antikörlerini içeren Simultest™ IMK Plus Kit (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose USA) ile yapıldı. Örneklerdeki lökosit sayısı $6000-8000/mm^3$ arası değerlere ayarlanarak $100\mu l$ 'ye $20\mu l$ monoklonal antikör eklendi. "Lyse-wash" (lisis ve yıkama) işleminden sonra BD FACS Calibur E1914 Flow sitometre cihazında FACS Comp V 4.0 software ile analiz edildi. Analizler öncesi cihazın günlük kalibrasyonu CaliBRITE™3 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose USA) kullanılarak yapıldı.

Kan CBZ düzeyleri DEÜTF merkez farmakoloji laboratuvarında EMIT 2000 convenience pack carbamazepine assay kiti kullanılarak ölçüldü.

İstatistik analiz

Sonuçlar ortalama \pm SD olarak hesaplandı. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

CBZ tedavisi alan epilepsili çocuklar, ilacı kesilmiş olarak izlenen epilepsili çocuklar ve sağlıklı

çocukların ortalama yaşları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.5$). CBZ almakta olan hastaların kan CBZ düzeyleri $7.88 \pm 2.01 \mu\text{g/ml}$ olup 4 – 12 $\mu\text{g/ml}$ terapötik aralığında idi. Bu hastaların CBZ kullanmakta olduğu ortalama süre 2.42 ± 0.99 yıl olup, 7 ay ile 4 yıl arasında değişmekteydi. Tablo I'de gösterildiği gibi her üç grubun periferik kan lökosit ve mutlak lenfosit sayıları, lenfositlerin total T hücre ve NK hücre yüzdeleri, T hücre CD3 molekül ekspresyonları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$). NK hücre yüzeyi CD16 + CD56 ekspresyonu CBZ kullanan ve ilacı kesilmiş olan epilepsili hasta gruplarında sağlıklı kontrol grubundakine göre anlamlı düşük bulundu ($p < 0.0000$).

TARTIŞMA

Epilepsili çocuklarda CBZ tedavisinin başlıca nörolojik, dermatolojik, hematolojik ve hepatik yan etkileri tanımlanmıştır. İmmünolojik fonksiyonlara olan etkileri konusunda ise henüz çalışmalar

yetersizdir (11,12). CBZ'in hematolojik yan etkilerinin geçici lökopeni şeklinde olduğu; aplastik anemi ve agranüloz gibi ciddi sorunlara çok nadir rastlandığı bildirilmektedir. Antikonvülzan tedavi alan 15 yaş altı 392 çocukta yapılan bir çalışma CBZ'in en iyi tolere edilen antiepileptik ilaç olduğunu göstermiştir (13).

Çalışmamıza alınan epilepsi hastalarında CBZ'e bağlı ciddi yan etki bildirilmemektedir. Hepsisi 6 aydan uzun süredir ilaç almakta olan bu hastalarda periferik kan lökosit ve mutlak lenfosit sayılarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Lenfositlerin total T hücre ve NK hücre yüzde oranları da aynı yaş grubundaki sağlıklı çocuklardaki değerlerden anlamlı farklı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Bu sonuçlar CBZ tedavisinin epilepsili çocuklarda daha önceki yıllarda bildirildiği gibi hücresel immün parametrelere sayısal yönden olumsuz etkileri olmadığını düşündürmüştür (11-13).

Tablo I. Karbamazepin alan, ilacı kesilmiş epilepsili ve sağlıklı çocuklarda periferik kan T ve NK hücre parametreleri

	CBZ Alan n=18	İlacı Kesilmiş Epilepsi n=16	Sağlıklı Kontrol n=18
BK/mm ³	6822 ± 2909	5344 ± 1090	6000 ± 2027
Lenfo/ mm ³	2494 ± 1057	1894 ± 590	2144 ± 991
T lenfo (CD3)%	67.39 ± 4.91	67.88 ± 6.59	69.11 ± 7.9
NK (CD16/56) %	13.41 ± 5.63	16.11 ± 4.29	14.19 ± 5.81
T hücre CD3 (MFI)**	306.44 ± 60.85	307.94 ± 25.27	305.0 ± 20.28
NK CD16/56 (MFI)	209.22 ± 75.87	210.94 ± 66.99	404.72 ± 86.13*

*: $p < 0.0000$

** MFI=Mean Fluorescence Intensity (ortalama floresans şiddeti)

Çalışmada ilginç bir bulgu T hücre yüzey CD3 molekül ekspresyonunun epilepsili çocuklar ve sağlıklı kontrol grup arasında anlamlı farklılık göstermemesine karşın NK hücre yüzeyi CD 16/56 molekül ekspresyonunun CBZ almakta olan ve tedavisi kesilmiş epilepsili hastaların oluşturduğu iki grupta da sağlıklı çocuklardakine göre anlamlı düşük olmasıdır ($p < 0.0000$). CD16 molekülü NK ve myeloid hücre yüzeylerinde yer alan düşük afiniteli bir Fc reseptörüdür. İmmün komplekslerdeki IgG yi bağlayarak NK hücrelerde sitotoksik aktiviteyi başlatır (14). Esas NK'lara özgü olan CD56 ise bir çeşit nöral hücre adhezyon molekülü olarak tanımlanmıştır (6).

Flow sitometrik immünofenotiplendirmede CD3, CD4, CD8, CD16/CD56 gibi bazı lenfosit yüzey moleküllerinin yardımıyla hücrelerin yüzde oranlarının saptanması bu analizlerden elde edilebilen bilgilerin ancak az bir bölümünü oluşturur. Bu çalışmada da olduğu gibi, bir lenfosit popülasyonunun floresan işaretli antikor kullanılarak değerlendirilmesinde light scatter = ışık saçılımı (LS) ve fluorescence intensity = floresans şiddeti (FI) gibi parametrelerden incelenen hücre hakkında ek bilgiler elde edilmektedir. LS hücrenin büyüklüğü ve iç yapısının kompleksliğine göre değişir. Genelde LS'm artması hücrenin metabolik aktivitesinde bir artışı yansıtır. Buradaki analizlerde ölçülen FI ise hücre yüzey moleküllerine bağlanan monoklonal antikor miktarı ile belirlenmektedir. Hücre yüzeyinde o molekül sayıca ne kadar artmış ise FI de artmaktadır. LS gibi FI'nin de hücrenin biyolojik fonksiyonları ile yakından ilişkili bir parametre olduğunu gösteren çalışmalar vardır (15).

Flow sitometrik analizde LS ve FI gibi parametrelerin hatasız ölçülebilmeleri için iyi bir kalibrasyon şarttır. Laboratuvarımızda flow sitometrik analizlerin günlük kalite kontrolü ve standard "microbead"ler (caliBRITE) ile cihazın floresans ayarları düzenli olarak yapılmaktadır. Ayrıca örnek kandan hücre hazırlamada kullanılan tam kan lizis yöntemi hücre yüzeyinden "shedding" adı verilen antijenik yapı dökülmesine yol açmadığı için diğerlerine göre daha çok önerilen bir yöntemdir (16).

NK hücre yüzeyinde spesifik molekül ekspresyonunun bu hücrelerin bazı fonksiyonel alt gruplarında farklılık gösterdiği bilinmektedir. Örnek olarak insanda desidual granüler lökositlerin morfolojik olarak NK hücreleri olduğu, ancak yüzeylerinde CD16 ekspresyonunun azalarak CD56'yı çok daha yüksek düzeyde ekspres ettikleri gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin periferik kan NK hücrelerinden farklı olarak standard periferik NK hücre targetlerine karşı zayıf litik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (17).

NK yüzeyinde CD16 ya da CD 56 molekül ekspresyonunun farklı NK fenotiplerinde fizyolojik olarak değiştiği gözlenirse de çalışmadaki her iki epilepsili çocuk grubunda sağlıklı çocuklara göre istatistiksel anlamlı olarak düşük düzeyde olması NK hücrelerde intrinsek bir immünolojik defekte bağlı olabilir.

Olguların bu yönden ilaç başlamadan önceki değerlerinin bakılmamış olması, bu bulgunun esas epilepsi ile ilişkili olarak yorumlanmasını güçleştirmektedir. Ancak, tedavisi kesilmiş olarak izlenen hastaların en az bir yıldan beri antiepileptik almadıkları göz önüne alınırsa, bu hastalarda da

CD16/56 ekspresyonunun istatistiksel anlamda düşük olması bu parametrenin ilaç tedavisinden etkilendiğini düşündürmemektedir.

Çocuklarda epilepsinin özellikle T hücre immünesinde değişikliklerle birlikte olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (9,10). Ancak, bu bulguların klinik anlamlılığı henüz belirlenememiştir. Gerek erişkin, gerek çocukluk çağı epilepsi olgularında genel kanı epilepsi zemininde çeşitli immünolojik eksikliklerin var olduğu ve antiepileptik ilaçların kendilerininin ya da metabolitlerinin bunları indükleyici etki yaptıkları yönündedir (2).

CBZ verilen erişkin epilepsi hastalarında ve fare

modellerinde NK'ların litik fonksiyonlarının arttığını gösteren çalışmalar sonucunda bu sitotoksik aktivitenin uzun dönemde olumsuz klinik sonuçlar doğurabileceği de düşünülmüştür (7,8). Son yıllarda NK benzeri immün reaktivitenin endokrin ve nöronal dokularda da var olduğunun gösterilmiş olması (18) NK hücre immün fonksiyonları ile nöroendokrin sistemin yakından ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Sonuç olarak çocukluk çağıının uzun süreli tedavi gerektiren bir nörolojik hastalığı olan epilepside özellikle NK hücreleri ile ilgili değişikliklerin sitotoksikite gibi daha ayrıntılı parametrelerle incelenmesi gerektiği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. De Ponti F, Lecchini S, Cosentino M, Costelletti CM, Malesei A, Frigo GM. Immunological adverse effects of anticonvulsants: What is their clinical significance. *Drug Safety* 1993;8:235-250.
2. Başaran N, Hıncal F, Kansu E, Çiğner A. Humoral and cellular immune parameters in untreated and phenytoin -or carbamazepine- treated epileptic patients. *Int J Immunopharmac* 1994;16:1071-1077.
3. Ferrarese C, Marzorati C, Perego M, et al. Effect of anticonvulsant drugs on peripheral benzodiazepine receptors of human lymphocytes. *Neuropharmacology* 1995; 34: 427.
4. Caldiroli E, DePonti F, Cosentino M, et al. Carbamazepine affects neutrophil function through an action on peripheral benzodiazepine receptors. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997; 19:367-382.
5. Caldiroli E, Manno F, Cosentino M, et al. Peripheral benzodiazepine receptor expression on leukocytes and neutrophil function during anticonvulsant monotherapy. *Pharmacology* 1998; 57: 215-221.
6. Christmas SE. The phenotype and functions of human natural killer (NK) cell populations *Turk J Immunol* 1997; 2: 11-15.
7. Pacifici R, Paris L, DiCarlo S, Pichini S, Zuccaro P. Immunologic aspects of carbamazepine treatment in epileptic patients. *Epilepsia* 1991; 32:122-127.
8. Pacifici R, DiCarlo S, Bacosi A, Pichini S, Zuccaro P. Immunomodulating properties of carbamazepine in mice. *Int J Immunopharmac* 1992; 14: 605-611.
9. Margaretten NC, Warren RP. Reduced natural killer cell activity and OKT4/OKT8 ratio in epileptic patients. *Immunol Invest* 1986;15:159-

- 167.
10. Eeg-Olofsson O, Prehal JF, Andermann E. Abnormalities of T-lymphocyte subsets in epileptic children. *Acta Neurol Scand* 1985; 72: 140-144.
 11. Lenti C, Masserini C, Peruzzi C, Guareschi Cazzullo A. Effects of carbamazepine and valproate on immunological assessment in young epileptic patients. *Ital J Neurol Sci* 1991;12:87-91.
 12. Pellock JM. Carbamazepine side effects in children and adults. *Epilepsia* 1987; 28: 64-70.
 13. Herrans JL, Armijo JA, Arteaga R. Clinical side effects of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine and valproate during monotherapy in children. *Epilepsia* 1988; 29:794-804.
 14. Imboden JB. T lymphocytes and natural killer cells. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, eds. *Medical Immunology*. ninth ed. London: Prentice Hall International Inc. 1997;143-144.
 15. Vogt RF Jr., Henderson LO, Ethridge SF, Avang EY, White JT, Meredith NK. Lymphocyte immunophenotyping with extended quantitative analysis of list mode files for epidemiologic health studies. In: Landay AL, Ault KA, Bauer KD, Rabinovitch PS, eds. *Clinical Flow Cytometry*, Vol 677. New York: Annals of the NY Acad Sci 1993; 462-464.
 16. Demirel GY. Akut lösemi ve Lenfoma'da immunofenotipleme. In: Yılmaz NT, Deniz G, eds. *Flow Cytometry ve Tıpta Kullanımı*, İstanbul: Bilmedya Grup, 1999; 33-46.
 17. King A, Loke YW. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* 1991; 12: 432-435.
 18. Sanno N, Itoh J, Teramoto A, Itoh Y, Hori S, Osamura RY. Immunohistochemical detection of human natural killer cell like immunoreactivity in human pituitary adenomas, using monoclonal antibody NK-1. *J Neuro-Oncol* 1997; 35: 29-38.